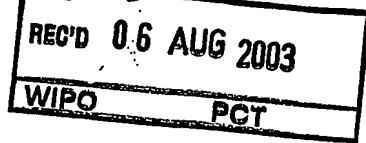


Rec'd PCT/PCTO 16 DEC 2004

PCT/CN03/00417

101518940



证 明

本证明之附件是向本局提交的下列专利申请副本

申 请 日： 2002 06 17

申 请 号： 02 1 23369.1

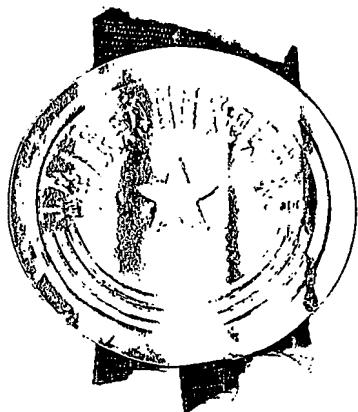
申 请 类 别： 发明

发明创造名称： 丙一谷二肽合成方法

申 请 人： 厦门大学

发明人或设计人： 赵玉芬； 唐果； 周宁

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED
BUT NOT IN COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



中华人民共和国
国家知识产权局局长

王景川

2003 年 7 月 15 日

Best Available Copy

权利要求书

- 1、丙一谷二肽合成方法，其特征在于 1) N 端保护的氨基酸 10mmol，与三苯基磷 10~30 mmol，六氯乙烷 10~30 mmol，在有机溶剂中反应 20min~3h，反应温度 -5~30℃，形成活泼酯；
2) 活泼酯与谷氨酰胺 10~30 mmol，在有机溶剂和无机碱水溶液的混合溶液中进行，有机溶剂和无机碱水溶液的体积比值为 0~4，反应温度为 -5~30℃，pH 控制在 8.5~13；
3) 用无机酸酸化至 pH≤3.0，然后脱去 N 端保护基团，可得到丙一谷二肽。
- 2、如权利要求 1 所述的丙一谷二肽合成方法，其特征在于 1) N 端保护的氨基酸 10mmol，与三苯基磷 15~20 mmol，六氯乙烷 15~20 mmol，在有机溶剂中反应 1.5~2h，反应温度 0~10℃，形成活泼酯；
2) 活泼酯与谷氨酰胺 15~20 mmol，在有机溶剂和无机碱水溶液的混合溶液中进行，有机溶剂和无机碱水溶液的体积比值为 0.5~2，反应温度为 5~10℃，pH 控制在 9.5~10.5；
3) 用无机酸酸化至 pH 为 2.0~3.0，然后脱去 N 端保护基团，可得到丙一谷二肽。
- 3、如权利要求 1 所述的丙一谷二肽合成方法，其特征在于 N 端保护的氨基酸有：N-(0,0-二异丙基)磷酰氨酸 (DIPP-1-Ala)，N-(0,0-二乙基)磷酰丙氨酸 (DEP-1-Ala)，N-(0,0-二甲基)磷酰丙氨酸 (DMP-1-Ala)，苄氧羰基丙氨酸 (Z-1-Ala)，(对甲氧羰基)苄氧羰基丙氨酸 (MZ-1-Ala)，叔丁氧羰基丙氨酸 (Boc-1-Ala)，2-(二连苯基)异丙氧羰基丙氨酸 (Bpoc-1-Ala)。
- 4、如权利要求 1 所述的丙一谷二肽合成方法，其特征在于有机溶剂有：二氯甲烷，甲苯，四氢呋喃，乙腈，1,2-二氯乙烷。
- 5、如权利要求 1 所述的丙一谷二肽合成方法，其特征在于有机溶剂有：乙醇，乙酸乙酯，石油醚，环己烷，甲苯，二氯甲烷。
- 6、如权利要求 1 所述的丙一谷二肽合成方法，其特征在于无机碱有：氢氧化钠，氢氧化钾，碳酸氢钠，碳酸氢钾，碳酸钠，碳酸钾。
- 7、如权利要求 1 所述的丙一谷二肽合成方法，其特征在于无机酸有：盐酸，硫酸，硝酸，磷酸。
- 8、如权利要求 1 所述的丙一谷二肽合成方法，其特征在于脱保护基的有：三氟乙酸，氯化氢/冰乙酸，溴化氢/冰乙酸，甲基磺酸，氢化还原，氯化氢/1,4-二氯六环，溴化氢/1,4-二氯六环。

说 明 书

丙一谷二肽合成方法

本发明涉及一种含氨基酸的二肽合成方法，尤其是一种丙一谷二肽合成方法。

谷氨酰胺是人体中含量最多的氨基酸，谷氨酰胺在肌肉蛋白质和血浆蛋白质中含量约分别为 75% 和 26%。

谷氨酰胺具有重要的生理作用。谷氨酰胺是生物合成核酸的必需前体物质，是蛋白质合成与分解的调节物，是氨基氮从外周组织转动至内脏的携带者，是肾脏排泄氮的重要基质。谷氨酰胺是肠粘膜上皮细胞、肾小管细胞、巨噬细胞和成纤维细胞的重要能量物质，在维持肠道机能，促进免疫功能，维持体内碱平衡及提高机体对应激的适应等方面都发挥着极其重要的作用。

在临床上的严重感染、复合性骨折、创伤、大手术、大面积烧伤与恶性肿瘤后期等应急和高分解代谢状态下，谷氨酰胺的需要大大超过了机体合成谷氨酰胺的能力，使体内谷氨酰胺的含量降低，从而使核酸、蛋白质合成减少。若采用传统的全静脉营养液 (TPN)，则可能导致肠粘膜萎缩，肠粘膜通透性升高和细菌易位，甚至导致败血症及多器官功能衰竭。大量的实验表明，补充 GLN 的 TPN 对许多疾病的预防和恢复有显著作用，若在 TPN 中加入一定量的谷氨酰胺，以提高血液和肌肉等组织中谷氨酰胺浓度，则对维持或恢复肠粘膜功能具有重要作用。给严重感染的病人输入补充 GLN 的 TPN，明显保持正氮平衡和促进细胞 GLN 合成酶的表达，减轻肌细胞内 GLN 浓度和核糖体浓度的降低。

近年来，因为谷氨酰胺重要的生理功能和药理作用，使其在肠外营养中的应用受到人们普遍的重视。如上所述，在各种创伤（包括意外伤、手术伤、及辐射伤）、感染等应激条件下，血中和细胞中的谷氨酰胺浓度降低，而补给现有的氨基酸制剂（不含 GLN），不能使其逆转；一些重要的细胞功能如蛋白质的合成、细胞的吞噬作用和淋巴细胞的增殖，都必须依赖充足的 GLN。但是由于它的溶解度低，而且溶液中不稳定，在加热灭菌的条件下，生成有毒的焦谷氨酸和氨，所以商品氨基酸制剂中都不含有 GLN。目前 GLN 的应用主要有以下途径：(1) 现配现用，把 GLN 晶体加到氨基酸溶液中，然后过滤除菌，在 8h 内输完。这一过程必须严格无菌操作且工作繁琐，费力，适用范围受到限制；(2) 合成 GLN 衍生物，如乙酰谷氨酰胺。它容易合成，加热稳定，在体内可形成 GLN，但是它的利用率较低，摄入量的 40% 被从尿中排泄掉；(3) 应用 GLN 的二肽。

目前，用于试验研究的二肽主要有两种：甘氨酰谷氨酰胺

(L-glynyl-L-glutamine, Gly-Gln) 和丙一谷二肽 (Ala-Gln)。动物和人体实验证明，在体内，这两种二肽很快被分为其组成氨基酸，半衰期很短，血液中只能检测到少量的二肽，仅有微量的二肽从尿中排出。说明 GLN 二肽可有效地利用而且不会在血积聚，避免了二肽可能产生的药理及生理性损害。有实验证明，健康人体长期静脉注射滴注 Ala-Gln 二肽没有任何副作用及不良反应，不影响正常的肾功能。用化学方法合成的 Ala-Gln 经纯化其溶解度是 GLN 单体的 20 倍，在储存和加热灭菌中也很稳定，而进入体内后即迅速分解成 GLN 而发挥作用，使 GLN 在 TPN 中的应用更加方便可行。

丙一谷二肽合成方法有如下 4 种：

1、首先将 GLN (谷氨酰胺) 的氨基进行保护，形成 Cbz-Gln；第二步，将 Cbz-Gln 的酰氨基保护形成 Cbz-Gln ($OC_{13}H_9$)；第三步，将 Cbz-Gln ($OC_{13}H_9$) 的羧基保护形成 Cbz-Gln ($OC_{13}H_9$) OMe；第四步，通氢气形成 Gln ($OC_{13}H_9$) OMe；第五步，加入 CBZ-ALA；第六步，对 CBZ-ALA 活化；第七步，CBZ-ALA 和 Gln ($OC_{13}H_9$) OMe 结合成肽；第八步，皂化脱甲酯；第九步，酸化脱去全部保护，形成丙一谷二肽。（文献 Yasutsugu Shimomishi, Studies on the Synthesis of Peptides Containing Glutamine as the C-Terminal. Y. Bull. Chem. Soc. Jpn. 1962, 35, 1966）该方法反应步骤太多，而且试剂昂贵，无实际应用价值。

2、利用 Z-Ala 与 HOSu 在 DCC 作用下，于 20~25℃ 反应 5h，过滤去二环己基脲，然后与未保护的 Gln 于碳酸氢钠的水溶液中进行合成。产物在甲醇中还原氢化，脱去保护基，即可得到丙一谷二肽。（文献 Katoh, T. Kurauchi, M. Eur. Pat 311, 057, 12 Apr. 1989）该方法的试剂昂贵，而且 DCC 反应后的产物难以除去，而且生产过程复杂。

3、利用 $COCl_2$ 与 Ala 反应生成混酐，然后与 Gln 在水中反应，pH 保持在 10.2。最后在酸溶液中脱去保护，即可得到丙一谷二肽。（文献 Frerst, P. Pfaendetr, P. Ger. Offen. DE 3206, 784. 01 Sep 1983）此方法的反应步骤简单，但光气为剧毒气体，而且该反应难以反应完全，对人体危害较大。

4、利用手性试剂氯代丙酸通过 $SOCl_2$ 活化，形成酰氯，然后与 Gln 在 NaOH 的水溶液中反应，pH 保持在 10。产物为氯代丙酰谷酰胺，再与液氮在一定的压力下反应，即可得到丙一谷二肽。（文献 Takahiro Sano, Toru Sugaya, Process Research and Development of L-Alanyl-l-glutamine, a Component of Parenteral Nutrition. Organic Process Research and Development. 2000, 4, 147-152）该反应的原料为手性试剂，极为昂贵，在合成酰氯步骤中，温度较高，副反应较多。该合成用于生产，成本太高。

本发明的目的在于提供一种原料便宜、合成工艺简单、设备简单、成本低、产率高、

有利于环保的丙一谷二肽合成方法。

丙一谷二肽合成方法的步骤：

1) N 端保护的氨基酸 (I) 10mmol, 与三苯基磷 (Ph₃P) 10~30 mmol, 最佳 15~20 mmol, 六氯乙烷 (C₂Cl₆) 10~30 mmol, 最佳 15~20 mmol, 在有机溶剂 (II) 中反应 20min~3h, 最佳 1.5~2h, 反应温度 -5~30°C, 最佳 0~10°C, 形成活泼酯;

2) 活泼酯与谷氨酰胺 10~30 mmol, 最佳为 15~20 mmol, 在有机溶剂 (III) 和无机碱水溶液 (IV) 的混合溶液中进行 (III 和 IV 的体积比值为 0~1, 最佳为 0.5~2,) 反应温度为 -5~30°C, 最佳为 5~10°C, pH 控制在 8.5~13, 最佳为 9.5~10.5;

3) 用无机酸 (V) 酸化至 pH≤3.0, 最佳为 2.0~3.0, 然后脱去 N 端保护基团 (VI), 可得到丙一谷二肽, 产率为 30%~65%。

其中 (I), N 端保护的氨基酸主要有: N-(0,0-二异丙基)磷酰氨酸 (DIPP-1-Ala), N-(0,0-二乙基)磷酰丙氨酸 (DEP-1-Ala), N-(0,0-二甲基)磷酰丙氨酸 (DMP-1-Ala), 苄氧羰基丙氨酸 (Z-1-Ala), (对甲氧羰基)苄氧羰基丙氨酸 (MZ-1-Ala), 叔丁氧羰基丙氨酸 (Boc-1-Ala), 2-(二连苯基)异丙氧羰基丙氨酸 (Bpoc-1-Ala), 等;

(II) 有机溶剂主要有: 二氯甲烷, 甲苯, 四氢呋喃, 乙腈, 1,2-二氯乙烷, 等;

(III) 有机溶剂主要有: 乙醇, 乙酸乙酯, 石油醚, 环己烷, 甲苯, 二氯甲烷, 等;

(IV) 无机碱主要有: 氢氧化钠, 氢氧化钾, 碳酸氢钠, 碳酸氢钾, 碳酸钠, 碳酸钾, 等;

(V) 无机酸主要有: 盐酸, 硫酸, 硝酸, 磷酸, 等;

(VI) 脱保护基的方法主要有: 三氟乙酸, 氯化氢/冰乙酸, 溴化氢/冰乙酸, 甲基磺酸, 氢化还原, 氯化氢/1,4-二氧六环, 溴化氢/1,4-二氧六环, 等。

与已有的丙一谷二肽合成方法相比, 本发明的主要优点是:

1) 原料极为便宜, 三苯基磷 100g 只需 50 元, 六氯乙烷 100g 只需 10 元, 而传统方法中的 HOBr 每 100g 需 1500 元, DCC100g 需 400 元, HOSU 每 100g 需 700 元; R-2-氯代丙酸每 1g 需 500 元;

2) 合成工艺简单, 中间产物 (活泼酯) 不需要分离和提纯处理, 直接进行下一步反应, 反应结束后, 副产物 (三苯基氧磷) 在有机相, 产物在水相, 产物容易分离提纯;

3) 第一步合成中省去了有机碱, 通常有机碱易挥发, 毒性大, 很多有机碱容易引起二肽的消旋, 而且一些有机碱难以除去, 本方法在第一步合成中在酸性介质中反应, 形成活

泼酯，而一般这类化合物的合成都需加入三乙胺等有机碱；

4) 在第二步反应中，采用了水相法，省去了谷氨酰胺氨基酸接保护基团保护和脱除保护基团，简化了合成路线，节约了成本，缩短了时间，提高了产率，节省了溶剂和试剂，对环境友好；

5) 由于第二步中采用了水相法，用无机碱代替了有机碱，减少了毒性，产物二肽不容易消旋，而且产物可直接分液得到，简化了生产设备，降低了生产成本，有利于环保；

6) 反应结束后，生成两个产物，其一为所需的丙一谷二肽，另一个为副产物（三苯基氧磷），三苯基氧磷为不挥发的固体，容易回收，可以作为一种试剂销售，既不污染环境，又可以创造利润；

7) 整个合成过程中所采用的试剂毒性均较小。

总之，本方法合成路线简单，原料便宜易得，有利于环保，生产工艺简单，成本低，有着很好的应用价值。

以下结合实施例对本发明作进一步的说明。

实施例 1： N—(0, 0—二异丙基) 磷酰丙氨酸，三苯基磷和六氯乙烷各 10 mmol 分别加入圆底烧瓶，再加入 20mL 四氢呋喃，于 30℃ 反应 2h 后，滴加到含有 15 mmol 谷氨酰胺，水 20mL，乙醇 10mL 的混合液中，反应中用氢氧化钠调 pH 为 10.5，反应温度为 -5℃，滴加后反应 2h。然后用浓盐酸酸化至 pH 为 3.0，水相浓缩后用饱和氯化氢/冰乙酸室温反应 5h，反应结束后加入乙醚 50mL，析出固体，将固体用乙醇—水重结晶得产物 L-Ala-L-Gln。产率 60%。

实施例 2： 三苯基磷 15mmol 用 20mL 二氯甲烷溶解，滴加到 N—(0, 0—二异丙基) 磷酰丙氨酸 10mmol，和六氯乙烷 20mmol，10mL 二氯甲烷的混合体系内，于 10℃ 反应 3h 后，滴加到含有 10mmol 谷氨酰胺，水 20mL，乙酸乙酯 20mL 的混合液中，反应中用氢氧化钠 10mmol，然后用碳酸氢钠调 pH 为 9.0，反应温度为 10℃，滴加后反应 1h。然后用稀硫酸酸化至 pH 为 2.0，水相浓缩后用 20% 溴化氢/冰乙酸室温反应 5h，反应结束后加入乙醚 50mL，析出固体，将固体用甲醇—水重结晶得产物 L-Ala-L-Gln。产率 30%。

实施例 3： 六氯乙烷 15mmol 用 10mL 1, 2 二氯乙烷，滴加到 N—(0, 0—二异丙基) 磷酰丙氨酸 10mmol，和三苯基磷 15mmol，10mL 1, 2 二氯乙烷的混合体系内，于 20℃ 反应 1.5h 后，滴加到含有 20mmol 谷氨酰胺，水 20mL 中，反应中用氢氧化钾调 pH 为 13，反应温度为 10℃，滴加后反应 2h。然后用稀硝酸酸化至 pH 为 1.5，水相浓缩后用三氟乙酸室温反应 10h，反应结束后加入乙醚 50mL，析出固体，将固体用异丙醇—水重结晶得产物 L-Ala-L

-Gln。产率 52%。

实施例 4: N-(0,0-二乙基)磷酰丙氨酸 10mmol, 三苯基磷 10mmol 和六氯乙烷 15mmol 分别加入圆底烧瓶, 再加入 20mL 乙腈, 于 15℃ 反应 2.5h 后, 滴加到含有 30mmol 谷氨酰胺, 水 20mL, 甲苯 30mL 的混合液中, 反应中用碳酸钠调 pH 为 8.5, 反应温度为 30℃, 滴加后反应 1h。然后用稀硫酸酸化至 pH 为 2, 水相浓缩后用饱和溴化氢/1,4-二氧六环室温反应 5h, 反应结束后加入乙醚 50mL, 析出固体, 将固体用四氢呋喃-水重结晶得产物 L-Ala-L-Gln。产率 50%。

实施例 5: 三苯基磷 20mmol 用 10mL 甲氨呋喃溶解, 滴加到 N-(0,0-二乙基)磷酰丙氨酸 10mmol, 和六氯乙烷 30mmol, 10mL 的四氢呋喃混合体系内, 于 -5℃ 反应 2h 后, 滴加到含有 10mmol 谷氨酰胺, 水 20mL, 乙醇 20mL 的混合液中, 反应中用氢氧化钠 10mmol, 然后用碳酸氢钠设 pH 为 9.5, 反应温度为 -5℃, 滴加后反应 2h。然后用浓盐酸酸化至 pH 为 3, 水相浓缩后用饱和氯化氢/冰乙酸室温反应 5h, 反应结束后加入乙醚 50mL, 析出固体, 将固体用乙醇-水重结晶得产物 L-Ala-L-Gln。产率 35%。

实施例 6: 六氯乙烷 30mmol 用 20mL 二氯甲烷溶解, 滴加到 N-(0,0-二乙基)磷酰丙氨酸 10mmol, 和三苯基磷 30mmol, 10mL 二氯甲烷的混合体系内, 于 0℃ 反应 40min 后, 滴加到含有 30mmol 谷氨酰胺, 水 20mL, 环己烷 10mL 的混合液中, 反应中用氢氧化钾调 pH 为 13, 反应温度为 20℃, 滴加后反应 30min。然后用稀硝酸酸化至 pH 为 1.5, 水相浓缩后用三氟乙酸室温反应 10h, 反应结束后加入乙醚 50mL, 析出固体, 将固体用 1,4-二氧六环-水重结晶得产物 L-Ala-L-Gln。产率 60%。

实施例 7: N-(0,0-二甲基)磷酰丙氨酸 10mmol, 三苯基磷 20mmol 和六氯乙烷 30mmol 分别加入圆底烧瓶, 再加入 20mL 甲苯, 于 5℃ 反应 1h 后, 滴加到含有 10mmol 谷氨酰胺, 水 20mL, 乙醇 5mL 的混合液中, 反应中用碳酸钠调 pH 为 9.5, 反应温度为 5℃, 滴加后反应 10min。然后用磷酸化至 pH 为 1.0, 水相浓缩后用三氟乙酸室温反应 15h, 反应结束后加入乙醚 50mL, 析出固体, 将固体用乙醇-水重结晶得产物 L-Ala-L-Gln。产率 40%。

实施例 8: 三苯基磷 30mmol 用 30mL 四氢呋喃溶解, 滴加到 N-(0,0-二甲基)磷酰丙氨酸 10mmol, 和六氯乙烷 30mmol, 10mL 四氢呋喃的混合体系内, 于 10℃ 反应 20min 后, 滴加到含有 30mmol 谷氨酰胺, 水 20mL, 环己烷 20mL 的混合液中, 反应中用氢氧化钠调 pH 为 12, 反应温度为 25℃, 滴加后反应 30min。然后用稀硝酸酸化至 pH 为 1.5, 水相浓缩后用 20% 溴化氢/冰乙酸室温反应 5h, 反应结束后加入乙醚 50mL, 析出固体, 将固体用甲醇-水得结晶得产物 L-Ala-L-Gln。产率 50%。

实施例 9: 六氯乙烷 20mmol 用 10mL 二氯甲烷溶解, 滴加到 N-(0,0-二甲基) 磷酰丙氨酸 10mmol, 和三苯基磷 20mmol, 20mL 甲苯的混合体系内, 于 0℃ 反应 3h 后, 滴加到含有 25mmol 谷氨酰胺, 水 20mL 中, 石油醚 60mL, 反应中用氢氧化钾 20mmol, 然后用碳酸钾调 pH 为 10, 反应温度为 0℃, 滴加后反应 1.5h。然后用浓盐酸酸化至 pH 为 2.5, 水相浓缩后用甲磺酸室温反应 20h, 反应结束后加入乙醚 50mL, 析出固体, 将固体用异丙醇一水重结晶得产物 L-Ala-L-Gln。产率 45%。

实施例 10: 叔丁氧羰基丙氨酸 (Boc-Ala) 10mmol, 三苯基磷 15mmol 和六氯乙烷 20mmol 分别加入圆底烧瓶, 再加入 20mL 1,2-二氯乙烷于 10℃ 反应 20min 后, 滴加到含有 30mmol 谷氨酰胺, 水 20mL, 环己烷 20mL 的混合液中, 反应中用氢氧化钾调 pH 为 11, 反应温度为 20℃, 滴加后反应 30min。然后用稀硝酸酸化至 pH 为 1.5, 水相浓缩后用三氟乙酸室温反应 15h, 反应结束后加入乙醚 50mL, 析出固体, 将固体用四氢呋喃一水重结晶得产物 L-Ala-L-Gln。产率 40%。

实施例 11: 三苯基磷 10mmol 用 10mL 甲苯溶解, 滴加到 10mmol 叔丁氧羰基丙氨酸 (Boc-Ala), 和六氯乙烷 10mmol, 20mL 甲苯的混合体系内, 于 5℃ 反应 2h 后, 滴加到含有 15mmol 谷氨酰胺, 水 20mL, 石油醚 60mL 的混合液中, 反应中用氢氧化钠调 pH 为 12, 反应温度为 10℃, 滴加后反应 1.5h。然后用稀硫酸酸化至 pH 为 1.5, 水相浓缩后用氯化氢/1,4-二氧六环室温反应 5h。反应结束后加入乙醚 50mL, 析出固体, 将固体用 1,4-二氧六环一水重结晶得产物 L-Ala-L-Gln。产率 52%。

实施例 12: 六氯乙烷 20mmol 用 10mL 四氢呋喃溶解, 滴加到叔丁氧基丙氨酸 (Boc-Ala) 10mmol, 和三苯基磷 20mmol, 10mL 四氢呋喃的混合体系内, 于 0℃ 反应 1.5h 后, 滴加到含有 20mmol 谷氨酰胺, 水 20mL 中, 二氯甲烷 15mL, 反应中用氢氧化钾 20mmol, 然后用碳酸钠调 pH 为 10, 反应温度为 8℃, 滴加后反应 2h, 然后用浓盐酸酸化至 pH 为 2.0, 水相浓缩后用甲磺酸室温反应 20h, 反应结束后加入乙醚 50mL, 析出固体, 将固体用甲醇一水重结晶得产物 L-Ala-L-Gln。产率 45%。

实施例 13: 苄氧羰基丙氨酸 (Z-Ala) 10mmol, 三苯基磷 10mmol 和六氯乙烷 10mmol 分别加入圆底烧瓶, 再加入 30mL 甲苯, 于 0℃ 反应 3h 后, 滴加到含有 25mmol 谷氨酰胺, 水 20mL 的混合液中, 反应中用氢氧化钠调 pH 为 12, 反应温度为 15℃, 滴加后反应 1.5h。然后用稀盐酸酸化至 pH 为 2.5, 水相浓缩后用氢气在甲醇中室温反应 15h, 得产物 L-Ala-L-Gln。产率 48%。

实施例 14: 三苯基磷 15mmol 用 10mL 四氢呋喃溶解, 滴加到 10mmol 苄氧羰基丙氨酸

(Z-Ala)，和六氯乙烷 20mmol, 10mL 四氢呋喃的混合体系内，于 0℃ 反应 1.5h 后，滴加到含有 18mmol 谷氨酰胺，水 20mL，二氯甲烷 40mL 的混合液中，反应中用氢氧化钾调 pH 为 13，反应温度为 0℃，滴加后反应 2h。然后用稀硫酸酸化至 pH 为 2.0，水相浓缩后氢气在甲醇室温反应 15h，得产物 L-Ala-L-Gln。产率 65%。

实施例 15：六氯乙烷 30mmol 用 10mL 乙腈溶解，滴加到苄氧羰基丙氨酸(Z-Ala)10mmol，和三苯基磷 20mmol, 10mL 乙腈的混合体系内，于 5℃ 反应 1.0h 后，滴加到含有 10mmol 谷按酰胺，水 20mL 中，反应中用氢氧化钠 20mmol，然后用碳酸氢钾调 pH 为 10，反应温度为 5℃，滴加后反应 2h。然后用浓盐酸酸化至 pH 为 3.0，水相浓缩后用三氟乙酸室温反应 40h，反应结束后加入乙醚 50mL，析出固体，将固体用 1, 4 二氧六环—水重结晶得产物 L-Ala-L-Gln。产率 45%。

实施例 16：六氯乙烷 30mmol 用 10mL 乙腈溶解，滴加到苄氧羰基丙氨酸(Z-Ala)10mmol，和三苯基磷 20mmol, 10mL 乙腈的混合体系内，于 10℃ 反应 2h 后，滴加到含有 15mmol 缬氨酸，水 20mL 中，用碳酸氢钠调 pH 为 9.5，反应温度为 10℃，滴加后反应 20min。然后用盐酸调至 pH 为 2.5，浓缩后用氢气脱保护基，得丙一缬二肽，产率 60%。

实施例 17：三苯基磷 10mmol，N-(0, 0-二乙基) 磷酰苯丙氨酸 10mmol，六氯乙烷 13mmol，加入 20mL 四氢呋喃，于 10℃ 反应 1h 后，滴加到 15mmol 亮氨酸中，反应用氢氧化钠调 pH 为 11，反应温度为 5℃，滴加后，反应 1h，然后用稀硫酸酸化至 pH 为 2.0，浓缩后，用氯化氢/1, 4-二氧六环脱保护，析出固体，将固体用乙醇—水重结晶，得产物苯一亮二肽，产率 50%。